

Entwicklung und Erprobung eines Aufbaus zur gezielten Bestrahlung einzelner biologischer Zellen an der Schwerionen-Mikrosonde der GSI

Vom Fachbereich Physik
der Technischen Universität Darmstadt

zur Erlangung des Grades
eines Doktors der Naturwissenschaften
(Dr. rer. nat.)

genehmigte Dissertation von
Dipl.-Phys. Markus Christian Heiß
aus Mosbach

Referent: Prof. Dr. G. Kraft
Korreferent: Prof. Dr. D. H. H. Hoffmann

Tag der Einreichung: 13.04.2004

Tag der Prüfung: 26.05.2004

Darmstadt 2004

D17

Inhaltsverzeichnis

Kapitel 1 Einleitung	1
Kapitel 2 Die Mikrosonde	4
2.1 Funktionsweise	4
2.2 Der Bestrahlungsaufbau	5
Kapitel 3 Der X-Y-Tisch	7
3.1 Aufbau	7
3.2 Bewegung	8
3.3 Einbau der Proben	10
Kapitel 4 Das Zellgefäß	12
4.1 Verwendete Materialien	13
4.1.1 Gehäuse	13
4.1.2 Folie	14
4.1.3 Dichtungsmaterial	15
4.1.4 Klebstoff	15
4.2 Design des Zellgefäßes	16
4.2.1 Erste Version	16
4.2.2 Zweite Version	17
4.2.3 Dritte Version	19
4.2.4 Vierte Version	20
4.3 Zellwachstum	21
4.3.1 Vorbehandlung der Folie	21
4.3.2 Vorbehandlung des Gehäuses	22
4.3.3 Montage des Zellgefäßes	22
4.3.4 Vorbehandlung der montierten Kammer	22
4.3.5 Einsaat und Kultivierung der Zellen	22
Kapitel 5 Das Vakuumfenster	24
5.1 Eigenschaften	24
5.1.1 Mechanische Eigenschaften	24
5.1.2 Eigenschaften zur Trefferdetektion	25
5.2 Getestete Materialien	26
5.2.1 B-dotierter CVD-Diamant	26
5.2.2 Siliziumnitrid (Si ₃ N ₄)-Folien beschichtet mit Gold und CsI	28
5.2.3 Materialauswahl	30

Kapitel 6 Zellerkennung 31

6.1	Hellfeld-Auflichtmikroskopie.....	31
6.2	Dunkelfeld-Auflichtmikroskopie.....	33
6.3	Differentieller Interferenzkontrast	34
6.4	Fluoreszenzmikroskopie	38

Kapitel 7 Die Steuerungssoftware 41

7.1	Datenaustausch	41
7.2	Kalibrierung der Strahlablenkung.....	41
7.3	Kalibrierung der Tischbewegung.....	43
7.4	Eingabe der Probandaten	44
7.4.1	Fläche der Probe	44
7.4.2	Eingabe der Referenzpunkte	44
7.5	Automatische Bestrahlung	45
7.5.1	Anfahren von Positionen.....	45
7.5.2	Objekterkennung.....	46
7.5.3	Objektauswahl.....	46
7.5.4	Strahl und Objekt ausrichten.....	46
7.5.5	Bestrahlung	47
7.5.6	Testbestrahlung.....	47

Kapitel 8 Erste Versuche 48

8.1	Trefferdetektion	48
8.2	Fokussierung des Strahls.....	49
8.3	Kalibrierung der Strahlablenkung.....	50
8.3.1	Kalibrierung mittels Szintillator	50
8.3.2	Kalibrierung mittels STIM.....	51
8.4	Bestrahlungen	51
8.4.1	Bestrahlung von Testproben	51
8.4.2	Testbestrahlung von Zellen.....	53
8.4.3	Zellbestrahlungen zu biologischen Fragestellungen	57

Kapitel 9 Zusammenfassung 59

Literaturverzeichnis..... 61

Kapitel 1

Einleitung

Nachdem Mikrosonden schon seit Längerem in den verschiedensten Gebieten wie Mikrostrukturierung, Lithographie oder der Untersuchung der Wirkung ionisierender Strahlung auf Mikroelektronik Anwendung finden, entwickelte sich in den letzten zehn bis fünfzehn Jahren auch das Interesse der Radiobiologen an diesen Instrumenten. Die Vorteile der Benutzung einer Mikrosonde gegenüber einer Breitfeldbestrahlung liegen dabei auf der Hand: Sie bietet die Möglichkeit, eine definierte Anzahl Ionen in ausgewählten Bereichen einzelner Zellen zu platzieren und so die deponierte Dosis und sogar deren Verteilung innerhalb der Zelle präzise zu kontrollieren.

An den Instituten, an denen eine solche gezielte Bestrahlung bereits möglich ist, wird damit hauptsächlich an drei Gebieten gearbeitet:

- Die Untersuchung des Strahlenrisikos bei der Bestrahlung mit niedrigen Dosen
Hierbei geht es hauptsächlich um die Erforschung des Effektes, dass Zellen sehr empfindlich auf niedrige Dosen reagieren, während die Strahlenbeständigkeit für höhere Dosen zunimmt ("low-dose hypersensitivity") [MAR93]. Durch die gezielte Bestrahlung kann bei diesen Experimenten die bei der Breitfeldbestrahlung auftretende statistische Verteilung der Ionentreffer pro Zelle vermieden und so wesentlich genauere Aussagen über deren Empfindlichkeit gemacht werden.
- Die Untersuchung des "Bystander-Effekts"
In den letzten Jahren wurde in einer Reihe von Experimenten gezeigt, dass es Wechselwirkungen zwischen bestrahlten und benachbarten unbestrahlten Zellen gibt. Diese führen dazu, dass auch die unbestrahlten Zellen vergleichbare Strahlenschäden wie die bestrahlten zeigen (Bystander-Effekt) [MOT01][MOR03]. Ein typisches Beispiel dafür ist das Experiment von Nagasawa und Little [NAG92], in dem eine Zellpopulation mit einer konventionellen Alpha-Quelle so bestrahlt wurde, dass statistisch weniger als 1% der Zellen von einem Teilchen durchdrungen wurden und trotzdem mehr als 30% der Zellen einen erhöhten Grad an DNA-Schäden zeigten.
Die Fähigkeit, mit einer Mikrosonde während der Experimente die zu bestrahlenden Zellen nach gewissen Kriterien auszuwählen und daher bei der Auswertung sicher zu sein, dass in allen anderen Zellen keine Dosis deponiert wurde, ermöglicht die präzise Untersuchung der verschiedensten Aspekte dieses Effektes [MIC04].
- Untersuchung strahlenempfindlicher Regionen in den Zellen
Mit Mikrosonden können einzelne Ionen in bestimmten Bereichen innerhalb einer Zelle platziert werden, wodurch die Untersuchung der Strahlenempfindlichkeit zellulärer Regionen möglich wird. So zeigten beispielsweise Untersuchungen am Gray Laboratory (Middlesex, UK) dass auch die Bestrahlung des Zytoplasmas bei menschlichen Fibroblasten zur Induktion von Schäden an der DNA führt [OZO00].

Bereits Mitte der 1980er Jahre wurde im Rahmen einer Promotion an der Gesellschaft für Schwerionenforschung (GSI) eine Einzelionen-Bestrahlungsapparatur konstruiert und an Bakteriensporen erprobt [WEI87]. Mit Hilfe eines aus einer aufgezätzten Ionenspur in Glimmer bestehenden Kollimators konnten dabei bereits Ionen bis 1,4MeV/u mit einer

Genauigkeit von etwa $\pm 1,5\mu\text{m}$ auf der Probe platziert werden. Nach einer weiteren Doktorarbeit, die sich mit der Inaktivierung von Säugetierzellen nach Ionenbeschuss befasste [KRA91], wurde die Arbeit an der Bestrahlungsapparatur jedoch wieder eingestellt.

Die ersten heute noch routinemäßig für den Einsatz in der Radiobiologie genutzten Mikrosonden, die Zellbestrahlungen mit Protonen und α -Teilchen mit Energien bis zu 6MeV erlauben, wurden 1991 an der Columbia Universität (New York, USA) [GEA91] und 1997 am Gray Laboratory [FOL97a][FOL97b] in Betrieb genommen. Mit dem 2001 fertig gestellten Aufbau am Japan Atomic Energy Research Institute (Takasaki, Japan) [KAM01] ist dagegen die Bestrahlung mit allen Ionen von Wasserstoff bis Gold mit Energien bis zu 10MeV/u möglich.

Ähnlich wie die an der GSI entwickelte, nutzen diese drei Apparaturen Kollimatoren, um die gezielte Bestrahlung durchzuführen, wobei darin hauptsächlich Silizium-, Edelstahl- oder Glaskapillaren verwendet werden. Diese Methode hat allerdings den Nachteil, dass es zu Streuungen der Teilchen an den Wänden des Kollimators kommt. Dies hat zum einen zur Folge, dass die Energie der Ionen, die die Probe erreichen, nicht mehr genau definiert ist, zum anderen wird der Strahlfokus durch die gestreuten Teilchen deutlich größer als der Durchmesser der Kapillare. So wird für die Mikrosonde am Gray Laboratory angegeben, dass bei der Benutzung einer Glaskapillare mit einer Länge von 1mm und einem Durchmesser von $1\mu\text{m}$ nur etwa 96% der eingestrahnten 3,5MeV Protonen mit einer Genauigkeit von $\pm 2,5\mu\text{m}$ platziert werden konnten [FOL97b]. Bei der Schwerionen-Mikrosonde am Japan Atomic Energy Research Institute liegen sogar nur etwa 85-90% der Teilchen innerhalb eines Bereiches mit $10\mu\text{m}$ Durchmesser [KAM01].

Diese Nachteile können mit fokussierenden Mikrosonden vermieden werden. Bei ihnen wird der Ionenstrahl durch eine Anordnung von Schlitzen und ionenoptischen Komponenten in einen Fokus mit wenigen hundert Nanometern Durchmesser gelenkt. Diese Systeme haben den zusätzlichen Vorteil, dass dieser Zielpunkt durch elektrische oder magnetische Felder bewegt werden kann. So ist es möglich, die Ionen mit Hilfe der Strahlablenkung auf die Positionen der Zellen zu zielen, wodurch die Bestrahlung im Vergleich zu den kollimierenden Mikrosonden, bei denen die Zellen vor die Mikroschlitze gefahren werden müssen, wesentlich schneller durchgeführt werden kann.

Diese Vorteile und das gestiegene Interesse von Radiobiologen an der gezielten Bestrahlung von Zellen sind die Gründe dafür, warum in den letzten Jahren an mehreren Instituten vorhandene fokussierende Mikrosonden so umgerüstet werden, dass damit Zellbestrahlungen möglich sind. So gibt es derartige Aktivitäten beispielsweise an der PTB in Braunschweig [GRE04], am CENBG in Bordeaux (Frankreich) [MOR01] und an der TU München [HAU04].

Ziel dieser Arbeit ist es, auch die Schwerionen-Mikrosonde an der GSI, mit der im Gegensatz zu allen anderen Mikrosonden mit allen Ionen von Kohlenstoff bis Uran mit Energien bis zu 11,4MeV/u gearbeitet werden kann, so zu modifizieren, dass damit Einzelzellbestrahlungen möglich sind. Dazu muss ein Weg gefunden werden, wie der fokussierte Ionenstrahl mit minimaler Streuung aus dem Vakuum des Strahlrohres auf die Zellen, die sich in normalem Umgebungsdruck befinden, gezielt werden kann. Daneben wird zur Bestrahlung mit einer definierten Teilchenanzahl ein zuverlässiger Trefferdetektor benötigt, der die Qualität des Mikrostrahls nicht zerstört. Aufgrund der horizontalen Strahllage muss außerdem ein Gefäß entwickelt werden, in dem die Zellen während der Bestrahlung in vertikaler Position gehalten werden können.

Bei diesen Modifizierungen ist zu beachten, dass an der Mikrosonde neben den radiobiologischen Untersuchungen auch weiterhin Experimente zu Strahlenschäden an Integrierten Schaltkreisen und zur Mikrostrukturierung durchgeführt werden sollen und deshalb ein einfacher Wechsel zwischen den dafür benötigten Bestrahlungsaufbauten möglich sein soll.

Kapitel 2

Die Mikrosonde

2.1 Funktionsweise

Die Mikrosonde, die sich am Ende des Linearbeschleunigers der GSI (UNILAC) befindet, ist ein Instrument, das die Fokussierung des Ionenstrahls bis auf fokale Durchmesser von etwa 500nm erlaubt [FIS85], mit dem aber auch einzelne Ionen mit der gleichen Genauigkeit auf einer Probe platziert werden können [FIS91]. Das dazu verwendete System aus Schlitzen und magnetischen Komponenten ist in Abb. 2.1 dargestellt.

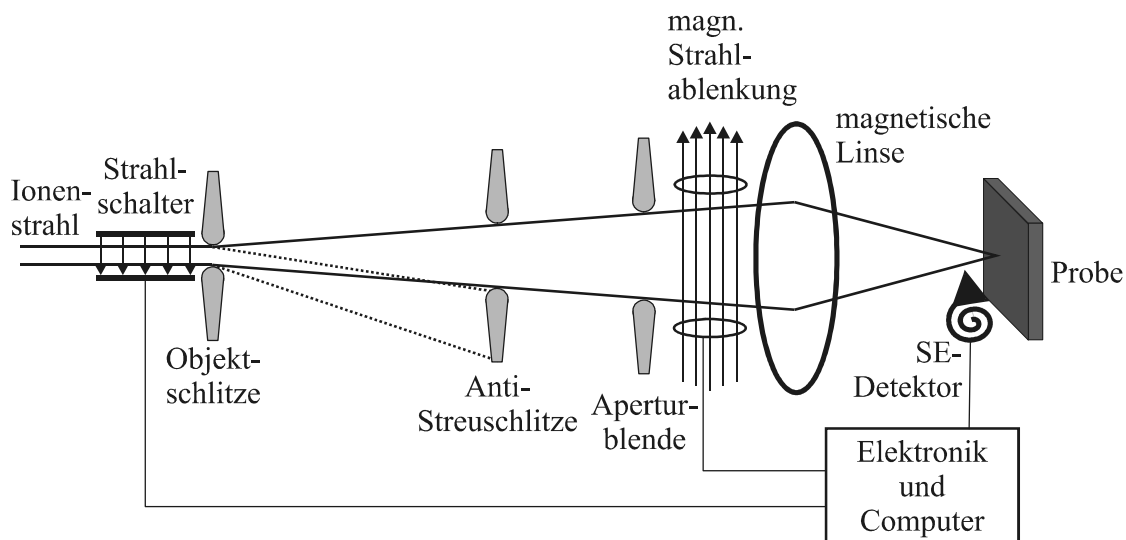


Abb. 2.1 Schematischer Aufbau der Mikrosonde

Die Ionen gelangen durch die Objektschlitze, die üblicherweise eine Öffnungsfläche von etwa $10 \times 10 \mu\text{m}^2$ besitzen und daher nur einen kleinen Teil des primären Ionenstrahls passieren lassen, in die Mikrosonde. Dort werden sie von einer magnetischen Quadrupol-Triplett-Linse auf die Probe fokussiert. Durch die Aperturblende mit einem Öffnungsdurchmesser von etwa $100 \mu\text{m}$, die sich direkt vor der Linse befindet, werden deren sphärische und chromatische Aberrationen begrenzt. Zusätzliche Anti-Streuschlitz sorgen dafür, dass nur wenige der an den Kanten der Objektschlitze gestreuten Ionen die Probe erreichen. Diese würden wegen ihrer veränderten Energie und des eventuell veränderten Ladungszustandes den Strahlfokus erheblich aufweiten. Vor der Linse befindet sich eine magnetische Strahl-ablenkung, die es erlaubt, den Fokus in der Objektebene horizontal und vertikal zu bewegen.

Die Detektion der Ionen wird in den meisten Experimenten mit Hilfe der Sekundärelektronen durchgeführt, die beim Auftreffen der Teilchen von der Probe emittiert werden. Daher befindet sich direkt vor der Probe ein Detektor, der in der Lage ist, diese Elektronen nachzuweisen.

Mit dem elektrostatischen Strahlschalter, der sich vor den Objektschlitzen befindet, kann durch Anlegen von 400V der Ionenstrahl innerhalb von 200ns so weit ausgelenkt werden, dass keine Ionen mehr die Probe erreichen. Bei für unsere Versuche typischen Teilchenraten von etwa 1000 Ionen/s und Energien von bis zu 11,4 MeV/u liegt die Wahrscheinlichkeit dafür, dass sich nach dem Anlegen der Abschaltspannung noch ein Ion hinter dem Strahlschalter befindet und so das Target erreicht, bei etwa $2,5 \times 10^{-4}$. Bei der Bestrahlung von biologischen Proben kann daher der Effekt von ungewollten Doppeltreffern, die auf die Abschaltzeit der Mikrosonde zurückzuführen sind, vernachlässigt werden.

2.2 Der Bestrahlungsaufbau

Um gezielte Bestrahlungen von Zellen durchführen zu können, mussten einige Veränderungen am Bestrahlungsaufbau hinter der Mikrosonde, in dem sich die Proben während der Experimente befinden, durchgeführt werden. Dieser ist in Abb. 2.2 schematisch mit allen wichtigen Komponenten dargestellt.

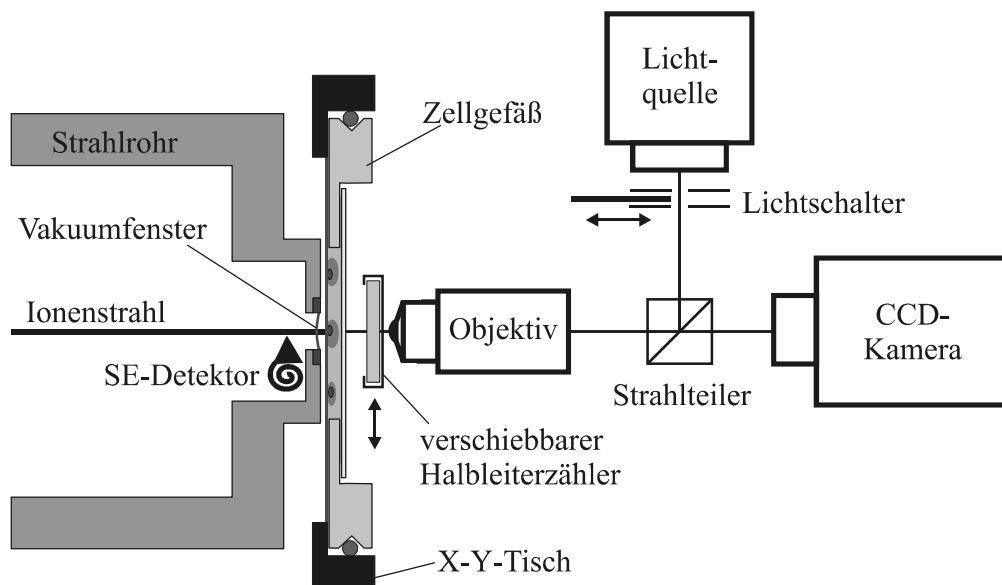


Abb. 2.2 Schematische Abbildung des Bestrahlungsaufbaus

Da die Zellen während der Bestrahlung in Nährmedium aufbewahrt werden sollen, kann der Bereich, in dem sie sich befinden, während der Experimente nicht evakuiert werden. Die Ionen können sich dagegen nur im Vakuum des Strahlrohres, in dem die Wahrscheinlichkeit für Stöße mit anderen Teilchen sehr gering ist, über längere Strecken geradlinig bewegen. Daher befindet sich am Ende des Strahlrohres ein dünnes Fenster, das Luft-eintritte in das Vakuum verhindert und das der fokussierte Ionenstrahl durchdringen kann, ohne allzu stark gestreut zu werden.

Durch die horizontale Lage des Strahls in der Mikrosonde wird ein Gefäß benötigt, das die Zellen während der Bestrahlung in einer Nährlösung in vertikaler Position hält. Der Boden dieses Gefäßes, an den sich die Zellen anhaften sollen und durch den sie auch bestrahlt werden, muss dabei möglichst dünn sein, um die Streuung des Strahls zu minimieren. Das Zellgefäß ist in einen X-Y-Tisch eingebaut, der die Bewegung der Probe mit einer

Genauigkeit von weniger als einem Mikrometer erlaubt. Hinter der Probe befindet sich ein optischer Aufbau, der neben Auflicht- und Nomarski- auch Fluoreszenzmikroskopie ermöglicht. Durch einen Halbleiterzähler, der hinter die Probe bewegt werden kann, besteht außerdem die Möglichkeit, Scanning Transmission Ion Microscopy, ein Mikroskopieverfahren, bei dem der Energieverlust an jeder Stelle der Probe gemessen wird, durchzuführen.

In den folgenden Kapiteln werden die einzelnen Komponenten dieses Aufbaus genauer beschrieben.

Kapitel 3

Der X-Y-Tisch

Da der Ionenstrahl mit Hilfe der magnetischen Strahlablenkung nur über einen Bereich von etwa einem Quadratmillimeter ausgelenkt werden kann, muss die Probe bei der Bestrahlung größerer Flächen vor dem Austrittsfenster des Strahls bewegt werden können. Hierzu dient der selbst konstruierte X-Y-Tisch, der sich auf dem Endflansch des Strahlrohres befindet, und in den die Proben während der Bestrahlung eingesetzt werden (siehe Abb. 3.1).

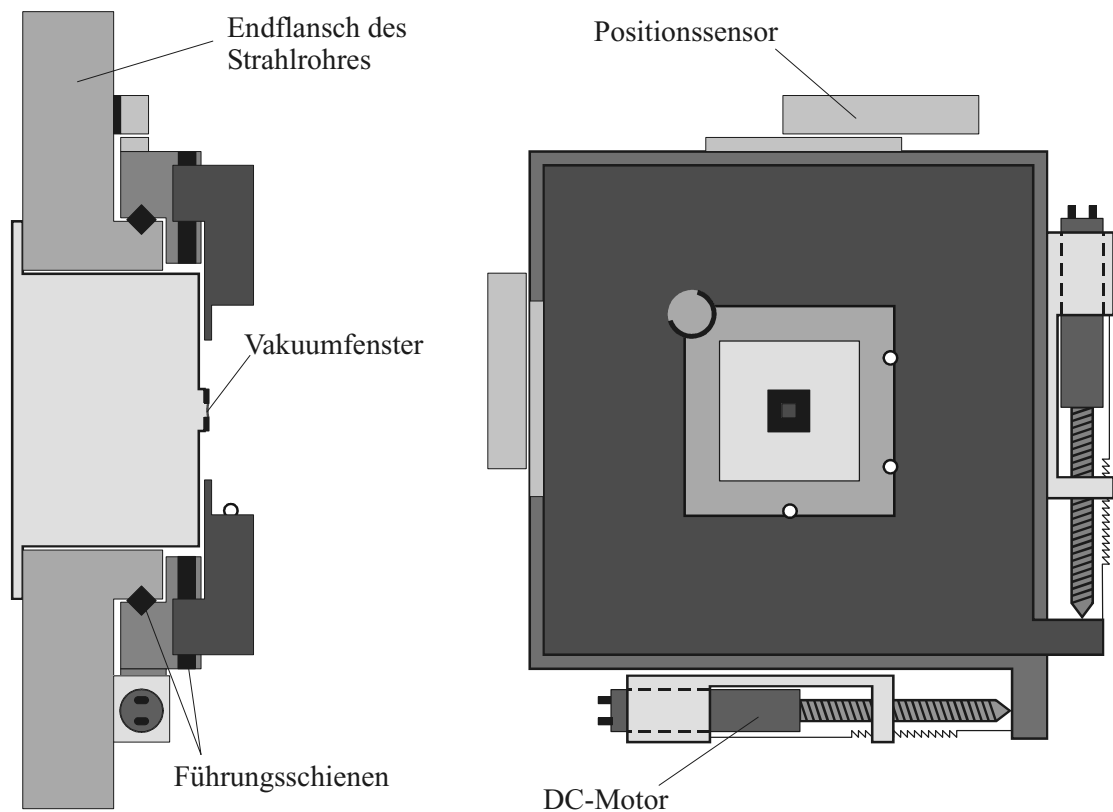


Abb. 3.1 Schematische Darstellung des X-Y-Tisches (links: Seitenansicht; rechts: Draufsicht)

3.1 Aufbau

Der Tisch besteht aus zwei übereinander liegenden Formteilen aus Metall, die auf den Endflansch des Strahlrohres montiert sind. Diese Teile sind mit ihrer Unterlage jeweils über Führungsschienen verbunden, so dass sie gegen diese in eine Richtung frei bewegt werden können. Da diese beiden Bewegungsrichtungen senkrecht zueinander stehen, können Proben, die sich im oberen Formteil des Tisches befinden, durch entsprechende

Verschiebung der einzelnen Tischebenen sowohl horizontal als auch vertikal in einem Bereich von jeweils etwa 10mm verfahren werden.

In der Mitte der oberen Platte befindet sich eine quadratische Aussparung, in die die Proben eingesetzt werden können. Über eine kleine Feder in der linken oberen Ecke der Aussparung werden sie gegen drei an den gegenüberliegenden Seiten angebrachten Saphirkugeln gedrückt. Diese greifen in die an den Kanten der Proben angebrachten V-Nuten (siehe Kapitel 4 "Das Zellgefäß") und sorgen dafür, dass die Proben vollflächig auf dem unteren Anschlag aufliegen. So ist gewährleistet, dass der Abstand zwischen dem Vakuumfenster und der Unterkante der Probe nicht mehr als 100µm beträgt.

3.2 Bewegung

Zur Bewegung des Tisches dienen zwei Gleichspannungsmotoren, die jeweils eine Feingewindeschraube mit einer Steigung von 0,25mm/Umdrehung antreiben. Die aktuelle Position des Tisches kann über zwei Positionssensoren, die auf Basis der photoelektrischen Abtastung zweier gegeneinander verschiebbarer optischer Strichgitter arbeiten, eingelesen werden. Hierzu wurden die entsprechenden Glasmaßstäbe zweier Messtaster des Typs MT2501 der Firma HEIDENHAIN am Tisch angebracht. Diese Komponenten haben den Vorteil, dass jeweils ein integrierter Referenzpunkt eingebaut ist, über die der Tisch in eine definierte Ausgangsposition gefahren werden kann.

Die Motoren des Tisches werden direkt von der Steuerungssoftware über zwei analoge Spannungsausgänge am Computer (siehe Kapitel 7 "Die Steuerungssoftware") gesteuert. Um vorgegebene Koordinaten präzise und schnell anfahren zu können, werden dabei die angelegten Spannungen als Funktion der Differenz zwischen aktueller und Zielposition berechnet mit:

$$U_{x/y} = \begin{cases} 6V & \text{für } 8,5\mu\text{m} < d_{x/y} \\ 0,8V + \left(\frac{d_{x/y}^4}{1000\mu\text{m}^4} \right) V & \text{für } 0,05\mu\text{m} \leq d_{x/y} \leq 8,5\mu\text{m} \\ 0V & \text{für } d_{x/y} < 0,05\mu\text{m} \end{cases}$$

wobei mit $d_{x/y}$ der Abstand zwischen Soll- und Ist-Position in x- bzw. y-Richtung bezeichnet wird.

Wie im Graph dieser Funktion (Abb. 3.2) zu sehen ist, wird bis zu einem Abstand von etwa 8,5µm zwischen der aktuellen und der Zielposition die Maximalspannung von 6V an die Motoren angelegt, wodurch eine Fahrgeschwindigkeit von etwa 250µm/s erreicht wird. Erst beim Unterschreiten dieses Abstands wird die Motorspannung und damit die Geschwindigkeit der Tischbewegung kontinuierlich bis auf 0,8V reduziert und bei einem Abstand von 0,05µm auf 0V gesetzt, wodurch ein sehr präzises Anfahren der erwünschten Position möglich ist.

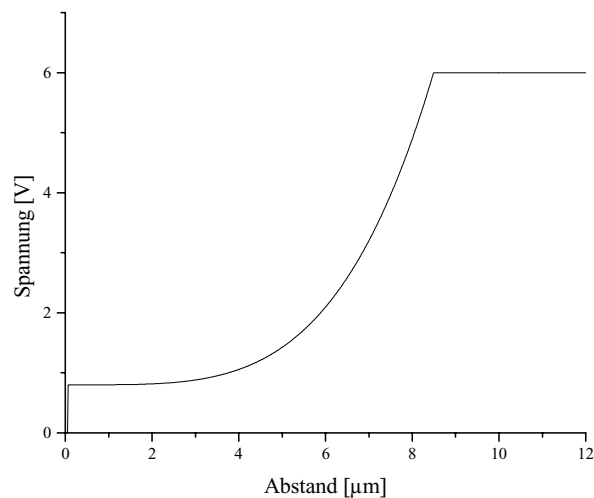


Abb. 3.2 Darstellung der beim Anfahren bestimmter Koordinaten an die Motoren angelegte Spannung als Funktion des Abstandes zwischen aktueller und Zielposition

Mit diesen Einstellungen wurden Versuche zur Präzision des Tisches beim Anfahren von Koordinaten durchgeführt, deren Ergebnisse in Abb. 3.3 dargestellt sind.

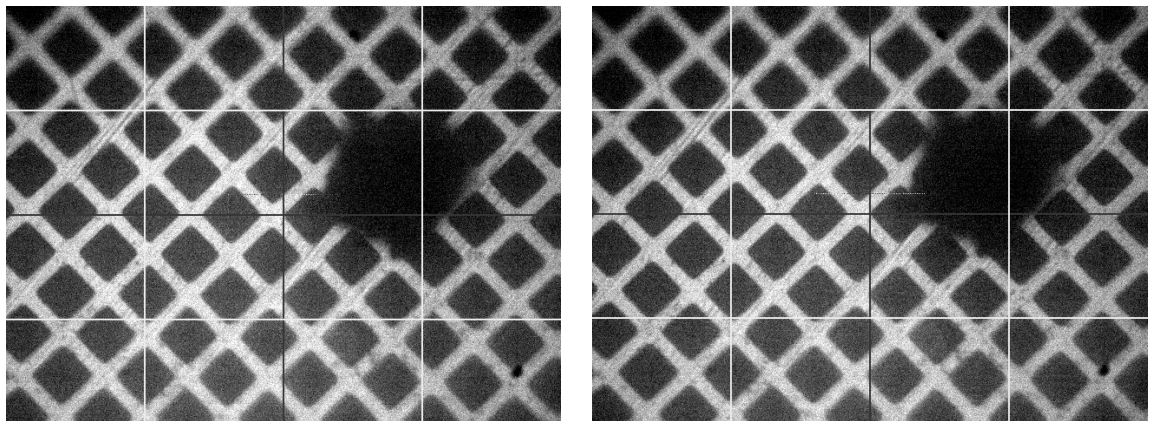


Abb. 3.3 Ergebnisse zur Untersuchung der Anfahrpräzision des Tisches: links: Ausschnitt der Probe (Kupfergitter, Gitterkonstante = $12,5\mu\text{m}$); rechts: Aufnahme der Probe, nachdem der Tisch bewegt wurde und die Koordinate der ursprünglichen Stelle wieder angefahren wurde. Der schwarze Punkt ist Schmutz auf der Probe, der zeigt, dass keine Verschiebung um ein Vielfaches der Gitterkonstanten stattgefunden hat

Das linke Bild zeigt den Ausschnitt eines Kupfergitters mit einer Gitterkonstante von $12,5\mu\text{m}$. Die Aufnahme im rechten Bild entstand, nachdem mit dem Tisch zehn verschiedene Positionen im gesamten erreichbaren Bereich und anschließend wieder die Koordinate des Ausgangspunktes angefahren wurden. Der dunkle Fleck in den Bildern ist Schmutz auf der Probe, der zeigt, dass es sich jeweils um den selben Ausschnitt der Probe handelt. Zum besseren Vergleich der Bilder sind darin dünne Linien eingezeichnet, die sich jeweils an der gleichen Position im Bild befinden. Die Differenz der Probenpositionen in

diesen beiden Bildern zeigt, dass die Präzision des Tisches beim Anfahren von Koordinaten im Bereich einiger zehntel Mikrometer liegt.

3.3 Einbau der Proben

Die im Unterkapitel 3.1 "Aufbau" beschriebene Probenhalterung im X-Y-Tisch soll gewährleisten, dass sich die Proben nach dem Einsetzen immer in der gleichen Position befinden. So bestünde die Möglichkeit, die Zellerkennung an einem externen Mikroskop mit gleicher Halterung durchzuführen und bei der Bestrahlung die dort bestimmten Koordinaten der Zellen zu übernehmen.

Um diese Möglichkeit zu überprüfen, wurden Versuche zur Reproduzierbarkeit der Positionierung beim Einsetzen der Probe durchgeführt. Hierzu wurde eine Probe vier Mal in die Halterung eingesetzt und jeweils eine Aufnahme von ihr gemacht. Die dabei entstandenen Bilder, in die wiederum Hilfslinien eingefügt wurden, sind in Abb. 3.4 zu sehen.

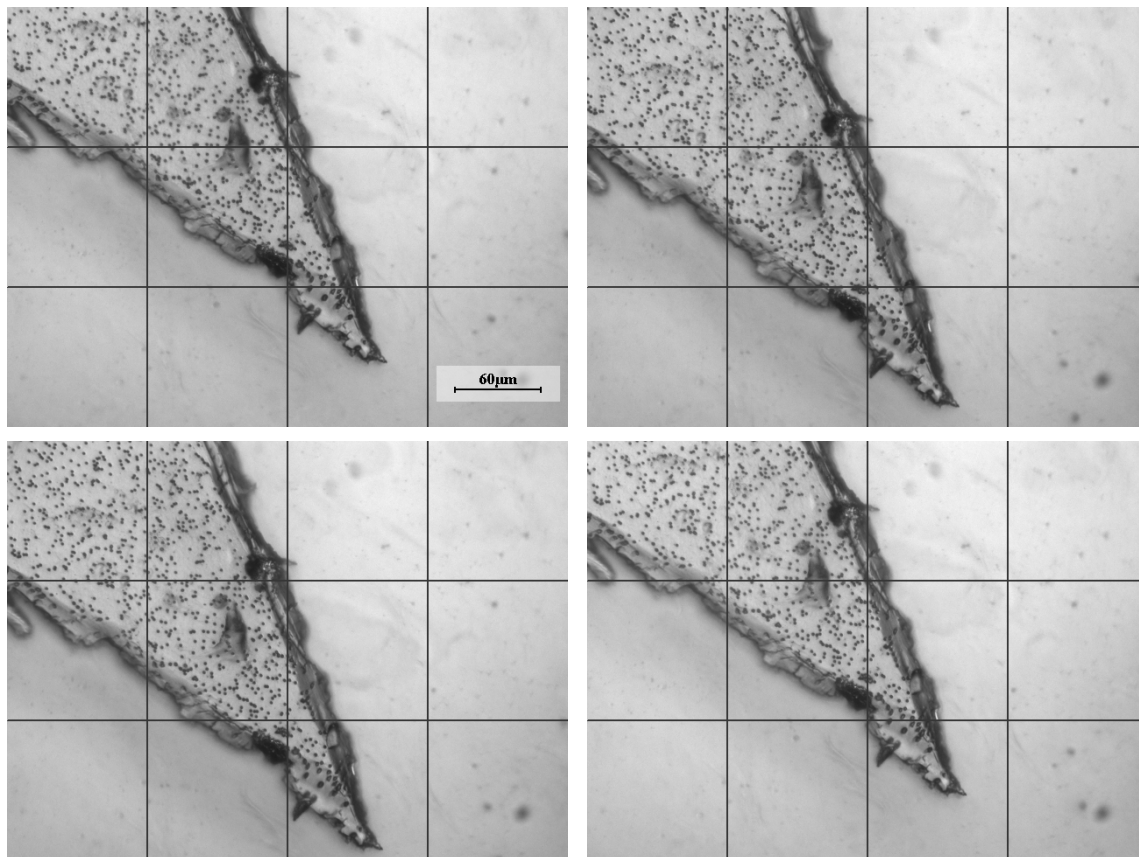


Abb. 3.4 Versuche zum reproduzierbaren Einbau der Probe: Die Probe wurde dreimal aus- und wieder eingebaut und jeweils eine Aufnahme gemacht

Der Vergleich dieser Bilder zeigt, dass sich die Position der Probe bei erneutem Einsetzen in die Halterung des Tisches um bis zu $40\mu\text{m}$ verändern kann. Bei solchen Schwankungen ist die direkte Übernahme der auf einem externen Mikroskop bestimmten Koordinaten von Zellkernen zur Bestrahlung nicht möglich. Da die Genauigkeit aber dennoch ausreicht, um

Objekte, deren Positionen bekannt sind, ins Bildfeld der Kamera zu fahren, können externe Koordinaten zum groben Anfahren der Objekte verwendet werden.

Dies ist bei solchen Experimenten interessant, bei denen nur wenige Zellen auf einer großen Probe verteilt sind. Dabei kann das sehr zeitaufwändige Absuchen der gesamten Probenfläche in der Mikrosonde mit einem Bildfeld von etwa $300\mu\text{m} \times 400\mu\text{m}$ durch die wesentlich schnellere Bestimmung der Zellpositionen in einem entsprechenden externen Mikroskop ersetzt werden. Nach der Übernahme und dem Anfahren der dort bestimmten Koordinaten muss dann allerdings nochmals eine Objekterkennung in der Mikrosonde durchgeführt werden, bevor die Bestrahlung durchgeführt werden kann.

Obwohl bei dieser Methode die Zellerkennung zweimal durchgeführt werden muss, kann doch die Bestrahlungszeit und damit der Stress, dem die Zellen ausgesetzt sind, deutlich reduziert werden.

Kapitel 4

Das Zellgefäß

Das Zellgefäß, in dem die Zellen kultiviert und bestrahlt werden und in dem auch die Beobachtungen nach der Bestrahlung stattfinden, wurde speziell für die Experimente an der Mikrosonde konstruiert (siehe Abb. 4.1).

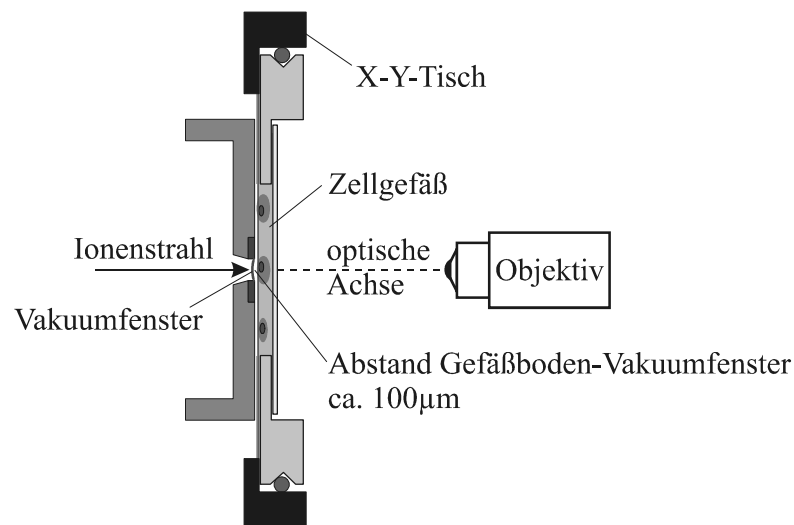


Abb. 4.1 Schematische Abbildung des eingebauten Zellgefäßes

Um die Präzision bei der gezielten Zellbestrahlung durch Streuung der Ionen in der Eintrittsfolie nicht mehr als notwendig zu beeinträchtigen, sollte der Boden des Zellgefäßes, auf dem sich die Zellen anheften und durch den sie bestrahlt werden, aus einer möglichst dünnen Folie bestehen. So kann die Wahrscheinlichkeit für nukleare Wechselwirkungen in diesem Material minimiert werden. Die Streuung der Teilchen durch elektronischen Energieverlust kann aufgrund der kurzen Distanz zwischen Streuzentrum und Objekten dagegen vernachlässigt werden.

Wegen der horizontalen Lage des Strahls in der Mikrosonde müssen die Zellgefäße verschließbar sein, sodass die Zellen senkrecht zum Strahl in einer Nährlösung gehalten werden können. Der dabei verwendete Deckel muss optisch transparent sein, da sich die Optik zur Zellerkennung hinter dem Zellgefäß befindet.

Die Zellgefäße sollten außerdem so gefertigt sein, dass sie präzise in den X-Y-Tisch passen. So kann zum einen sichergestellt werden, dass der Abstand zwischen Vakuumfenster und dem Boden der Kammer, der auch die Streuung der Ionen beeinflusst, gering ist. Zum anderen ermöglicht das reproduzierbare Einsetzen der Probe die Übernahme von auf einem externen X-Y-Tisch bestimmte Zellpositionen für die Bestrahlung.

Neben den technischen Eigenschaften ist es für biologische Experimente von sehr großer Bedeutung, dass sich die Zellen in den Kammern möglichst ähnlich verhalten, wie sie es auch in Standard-Petrischalen tun. Dies ist besonders bei der Materialauswahl und der

Vorbehandlung der Kammern zu berücksichtigen.

Im Folgenden wird die Entwicklung des aktuellen Zellgefäßes beschrieben, wobei bei der Darstellung der Versionen auf die bei der jeweiligen Konstruktion aufgetretenen Probleme eingegangen werden wird.

4.1 Verwendete Materialien

Neben der mechanischen Tauglichkeit ist der wichtigste Aspekt bei der Materialauswahl deren Einfluss auf die Zellen. Um diesen zu testen, wurden für einige wichtige Materialien Wachstumskurven von Zellen, die mit ihnen in Kontakt waren, aufgenommen und mit denen unbeeinflusster Zellen verglichen. Dazu wurden in Standard-Petrischalen (NUNC, Wiesbaden; Fläche = 8,5 cm²) je 500 CHO-K1 Zellen eingesät und das zu testende Material mit in das Nährmedium¹ gegeben. Etwa eine Stunde nach der Aussaat wurden in jeder Schale mit Hilfe eines computergesteuerten Verschiebetisches die Positionen von etwa 50 Zellen bestimmt und gespeichert. Im Abstand von etwa zwölf Stunden wurden diese Positionen wieder angefahren und die Anzahl der Zellen dort ermittelt. So konnte für jede Probe die Wachstumsrate direkt über die Zellzahlen bestimmt werden (siehe als Beispiel Abb. 4.2). Die Diagramme der entsprechenden Wachstumskurven sind bei den einzelnen Materialien im Vergleich zu den Referenzproben dargestellt.



Abb. 4.2 Aufnahmen einer Position 9, 45 und 80 Stunden nach Aussaat der Zellen zur Messung von Wachstumsraten

4.1.1 Gehäuse

Von Beginn an wurde für die Gehäuse und Deckel der Zellgefäße der an der GSI häufig eingesetzte Edelstahl 1.4301 verwendet. In entsprechenden Versuchen zeigte sich, dass das Zellwachstum durch den Kontakt des Nährmediums mit diesem Material nicht beeinflusst wird (siehe Abb. 4.3), weshalb es bei allen bisher produzierten Kammern verwendet wurde.

¹ CHO-K1-Zellen wurden in Hams F12 Medium (Biochrom, Berlin) mit 1% Penicillin/Streptomycin, 10% fötalem Kälberserum und 1% stabilem Glutamin bei 37°C, 98% Luftfeuchtigkeit und 5%CO₂ kultiviert.

Die verwendeten humanen AG1522 Fibroblasten (Coriell Cell Repository, Camden, NJ, USA) wurden in EEMEM-Nährmedium (Bio-Whittaker, Belgien) mit 1% Penicillin/Streptomycin, 15% fötalem Kälberserum und 1% stabilem Glutamin bei 37°C, 98% Luftfeuchtigkeit und 5%CO₂ kultiviert. Während der Bestrahlung wurde dieses Medium durch solches ersetzt, das 20mM HEPES (pH 7,2) enthielt.

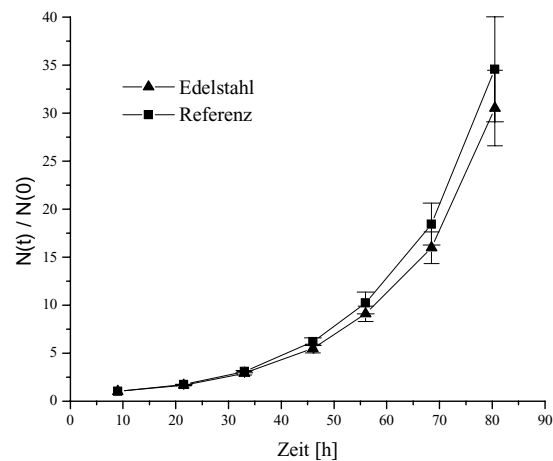


Abb. 4.3 Wachstumskurve unter dem Einfluss von Edelstahl im Vergleich zu einer Referenzschale

Der einzige Nachteil des Edelstahls liegt darin, dass er schwierig zu bearbeiten ist. Aus diesem Grunde wurde auch der Einsatz von Aluminium für Gehäuse und Deckel in Erwägung gezogen. Allerdings konnten aus zeitlichen Gründen bisher keine entsprechenden Wachstumskurven aufgenommen werden.

4.1.2 Folie

Die Folie, die den Boden des Zellgefäßes bildet, sollte möglichst dünn sein, um die Streuung der Ionen zu minimieren, muss dabei aber auch so stabil sein, dass sie im normalen Umgang nicht zerstört wird. Um die Zellerkennung vor und die Beobachtung nach der Bestrahlung nicht zu erschweren, sollte die Folie außerdem optisch transparent und nicht fluoreszierend sein. Wichtig ist zudem, dass sich die Zellen auf dem Material kultivieren lassen und in ihrem normalen Wachstum möglichst nicht beeinflusst werden.

Für diesen Zweck wurden mehrere Materialien in Erwägung gezogen:

- Polypropylen:
Dieses Material wird bei den Versuchen im Gray-Lab benutzt [FOL97a]. Es ist optisch transparent und besitzt keine Eigenfluoreszenz. Herstellungsbedingt besitzen dünne Folien dieses Materials optisch sichtbare Strukturen, die aber bei der verwendeten Zellerkennungsmethode nicht störend wirken. Die Folien sind ab einer Dicke von $4\mu\text{m}$ kommerziell erhältlich und auch in diesen Dicken noch sehr stabil.
- Mylar-Folie (Polyethylenterephthalat):
Auch dieses Material wird im Gray-Lab als Trägerfolie in den dort verwendeten Zellgefäßen verwendet [FOL97a]. Im optischen Bereich ist es transparent, zeigt aber bei Anregung mit UV-Licht Eigenfluoreszenzen, die speziell bei der Zellerkennung mit Fluoreszenzmethoden sehr störend sind. Dieses Material kann auch in Dicken unter $1\mu\text{m}$ erworben werden und ist mechanisch noch stabiler als Polypropylen
- Biofolie:
Diese in den Zellkammern der PTB verwendete Trägerfolie [GRE04] wird eigens für die Benutzung im biologischen Bereich hergestellt [Vivascience, Hannover]. Optisch ist sie transparent und zeigt auch keine Eigenfluoreszenzen. Problematisch ist hingegen, dass sie erst in Dicken ab $11\mu\text{m}$ erhältlich ist.
- Polycarbonat und Polyimid:
Auch diese beiden Materialien wurden in Erwägung gezogen. Sie sind aber optisch

nicht transparent und zeigten bei Anregung mit UV-Licht starke Fluoreszenzerscheinungen, die spätestens bei der Auswertung der Proben große Probleme bereitet hätten.

Unter Berücksichtigung der Eigenschaften der einzelnen Materialien ist Polypropylen als Trägerfolie für die Zellgefäße am besten geeignet. Um darauf erfolgreich Zellen wachsen zu lassen, ist eine Vorbehandlung der Folie notwendig, die im Unterkapitel 4.3 „Zellwachstum“ beschrieben wird.

4.1.3 Dichtungsmaterial

In einigen Versionen der Zellkammern (siehe Unterkapitel 4.2 „Design des Zellgefäßes“) wurden Dichtungsringe zum Abdichten der Kammer oder zum Spannen der Bodenfolie verwendet. Nachdem sich herausstellte, dass das anfangs benutzte Dichtungsmaterial "Perbunan" toxisch ist, wurden Silikon und Teflon als Ersatz getestet. In Versuchen zum Zellwachstum zeigte sich, dass Teflon die Vermehrung der Zellen praktisch nicht beeinflusst (siehe Abb. 4.4), während bei Silikon ein leicht verringertes Wachstum festgestellt wurde. Teflon kann also problemlos in der Kammer eingesetzt werden, während bei Silikon darauf geachtet werden sollte, dass es möglichst nicht mit dem Nährmedium in Kontakt kommt.

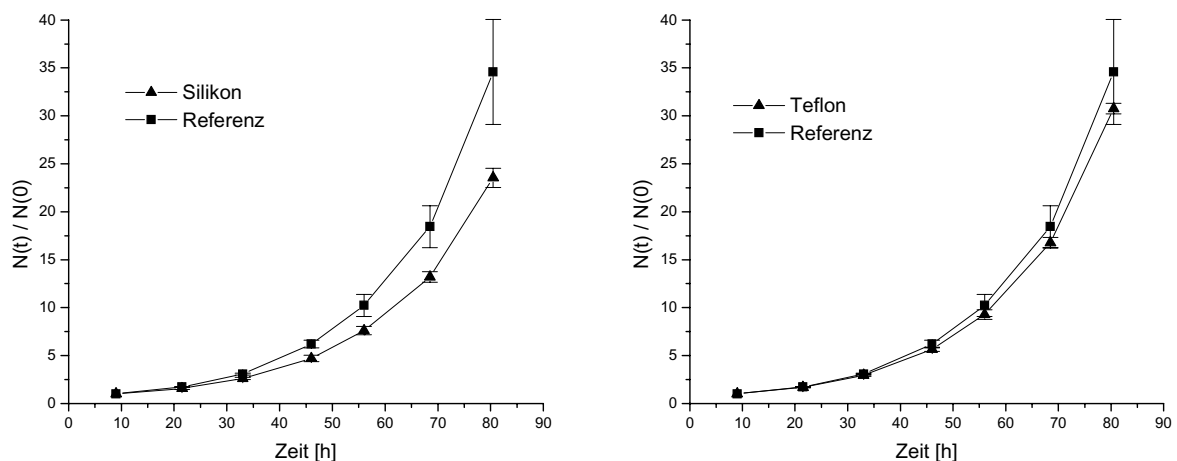


Abb. 4.4 Wachstumskurven unter dem Einfluss von Silikon (links) und Teflon (rechts) im Vergleich zu einer Referenzschale

4.1.4 Klebstoff

In den verschiedenen Varianten des Zellgefäßes wurde immer wieder Klebstoff verwendet, mit dem zuerst ein Glas im Deckel, später die Folie auf dem Boden der Kammer befestigt wurde. Bei dessen Auswahl war neben der Klebekraft wichtig, dass er wasserfest und vor allem nicht toxisch ist. Es stellte sich heraus, dass die Zellen absterben, wenn der an der GSI verwendete Standard-Klebstoff „UHU-Plus endfest 300“ mit dem Nährmedium in Kontakt ist.

Bei der Suche nach einem möglichst chemikalienfreien Klebstoff-Ersatz entstand die Idee, Wachs zu verwenden. Während sich in den Wachstumsversuchen Bienenwachs als nicht zellfreundlich herausstellte, zeigten die Zellen bei Kontakt mit handelsübliches Kerzenwachs (Stearin) keine Veränderungen in der Wachstumsrate (siehe Abb. 4.5)

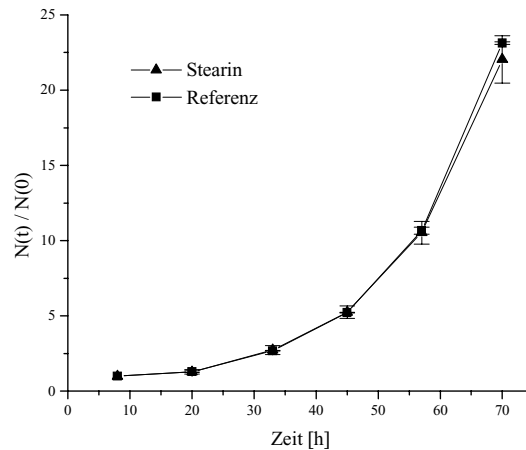


Abb. 4.5 Wachstumskurven unter dem Einfluss von Stearin im Vergleich zu einer Referenzschale

Da die Klebekraft des Stearin ausreicht, um die Polypropylenfolie auf dem Boden der Kammer zu befestigen und außerdem Klebstoffreste nach dem Gebrauch der Kammer sehr einfach durch Erhitzen entfernt werden können, wird in den aktuellen Versionen des Zellgefäßes nur noch dieser Klebstoff verwendet.

4.2 Design des Zellgefäßes

Das Design des Zellgefäßes veränderte sich im Laufe der Zeit entsprechend den jeweils gewonnenen Erfahrungen und Versuchsergebnissen. Hier sollen die wichtigsten Konstruktionen und Ergebnisse dargestellt werden.

4.2.1 Erste Version

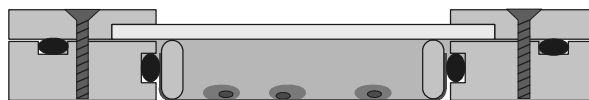


Abb. 4.6 Schematische Darstellung der ersten Version des Zellgefäßes

Bei der ersten Version der Zellkammer (siehe Abb. Abb. 4.6) wird die Bodenfolie zwischen einen Metallring und einen elastischen Dichtungsring geklemmt, um ein Verkleben des Bodens zu vermeiden und eine einfache Wiederverwendung des Zellgefäßes zu ermöglichen. Das Gefäß kann mit einem Deckel aus Edelstahl verschlossen werden, der in der Mitte ein mit einem Deckglas abgedichtetes Fenster besitzt, durch das die Zellen mikroskopiert werden können. Dieser Deckel wird mit vier Schrauben am Zellgefäß

befestigt, wobei ein weiterer Dichtungsring das Austreten von Flüssigkeit aus der Kammer verhindert.

Diese Konstruktion erlaubt eine sehr schnelle und einfache Montage der Folie in der Kammer (siehe Abb. 4.7). Da außerdem keine wärmeempfindlichen Materialien verwendet werden, können die montierten Zellgefäße komplett in einem Autoklaven sterilisiert werden.

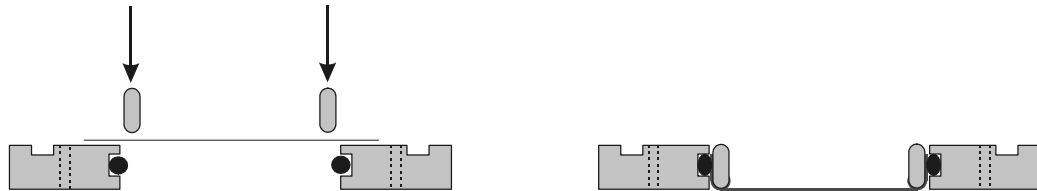


Abb. 4.7 Einbau der Bodenfolie in die erste Version des Zellgefäßes

Nachteilig an diesem Design ist, dass durch die Flexibilität des Dichtungsringes, mit der die Folie gespannt wird, diese nicht zwingend in der Ebene des Zellkörperbodens liegt. Dies hat zur Folge, dass der Luftspalt zwischen Vakuumfenster und Folie größer als die angestrebten 100µm sein kann. Außerdem ist bei einer Schiefelage der Folie ein Nachfokussieren der Optik beim Mikroskopieren der Zellen notwendig, wenn die Kammer im X-Y-Tisch bewegt wird.

Aus diesen Gründen und durch Anregung der in der PTB benutzten Kammer [FRA02] [GRE04], entschieden wir uns, die Folie auf den Boden des Zellgefäßes zu kleben.

4.2.2 Zweite Version

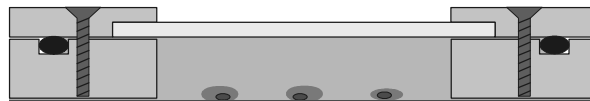


Abb. 4.8 Schematische Darstellung der zweiten Version des Zellgefäßes

Wie in Abb. 4.8 zu sehen ist, unterscheidet sich die zweite Version der Zellkammer von der ersten nur darin, dass die Folie, die den Boden der Kammer bildet, nicht geklemmt, sondern auf das Gefäß geklebt wird. Hierzu wird, wie in Kapitel 4.1 „Verwendete Materialien“ bereits erwähnt, Stearin verwendet, das einen Schmelzpunkt von ca. 60°C besitzt. Deshalb ist es nicht mehr möglich, die kompletten Zellgefäße im Autoklaven zu sterilisieren. Stattdessen wurden Anfangs die einzelnen Komponenten vor der Montage autoklaviert und danach nochmals in 70%igem Ethanol sterilisiert. Bald darauf stellten wir jedoch fest, dass die Sterilisation des montierten Gefäßes in Ethanol ausreicht (siehe auch Kapitel 4.3 „Zellwachstum“).

Mit diesen Zellgefäßen wurden dann die ersten Versuche im Bestrahlungsaufbau durchgeführt, wobei neue Schwierigkeiten auftraten:

- Beim Schließen des Deckels entsteht in der Kammer ein Überdruck, sobald der Deckel voll auf dem Dichtungsring aufliegt und die Befestigungsschrauben weiter angezogen werden (siehe Abb. 4.9). Dadurch kommt es zu einer Ausbeulung der Folie, die dazu führt, dass die Folie das Vakuumfenster berührt. Dabei besteht die Gefahr, dass das Zellgefäß

oder das Vakuumfenster beim Verfahren des Tisches zerstört werden.

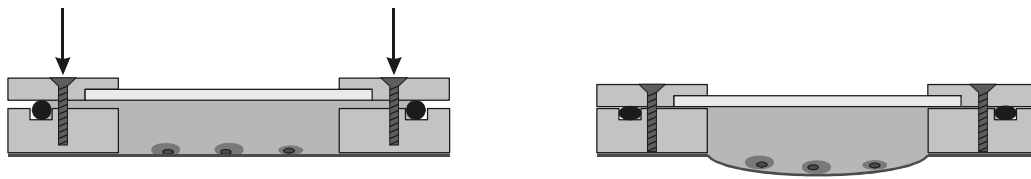


Abb. 4.9 Schematisch Darstellung der Folienausbeulung beim Schließen der Kammer

Abhilfe für dieses Problem schaffte ein kleines Loch im Deckel innerhalb des Dichtungsringes, das für konstanten Druck im Innern der Kammer sorgt. Diese Öffnung hat aber zur Folge, dass die Sterilität der Probe nicht mehr sichergestellt ist.

- Beim Einsetzen der Kammer in den X-Y-Tisch ist nicht gewährleistet, dass diese vollflächig an den Anschlängen des X-Y-Tisches anliegt. Dadurch kann der Luftspalt zwischen Vakuumfenster und Probe größer als die geplanten $100\mu\text{m}$ werden. Außerdem ist dann ein Nachfokussieren des Mikroskops beim Verfahren des Tisches notwendig. Dieses Problem wurde durch zwei V-förmige Nuten an den Seiten des Zellgefäßes, an denen es gegen die Saphirkugeln (siehe Kapitel 3 "Der X-Y-Tisch") gedrückt wird, gelöst. Diese sorgen dafür, dass eine zusätzliche Kraft auf die Kammer ausgeübt wird, die sie in Richtung der Anschläge drückt.

- Beim Schließen der Kammer kam es häufig vor, dass durch eingeklemmtes Dichtungsmaterial der Deckel nicht vollständig auf dem Gefäß auflag. Da er daher nach dem Einbau des Zellgefäßes in die Mikrosonde nicht ganz senkrecht zur optischen Achse der Optik stand, kam es zum in Abb. 4.10 dargestellten Fehler bei der Positionsbestimmung der Zellen.

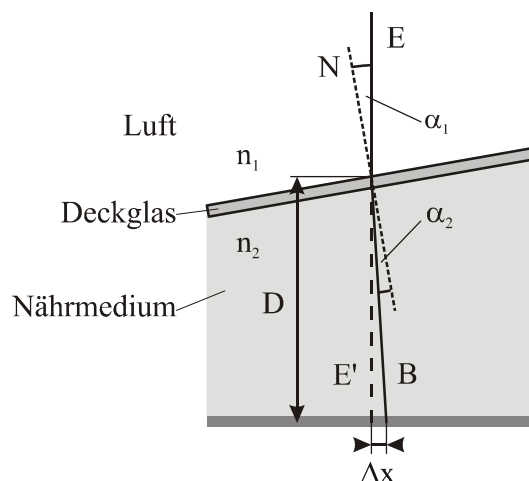


Abb. 4.10 Darstellung zum Fehler bei der Positionsbestimmung durch eine schiefe Oberfläche

Der einfallende Lichtstrahl E wird an der Grenzfläche Luft-Deckglas und Deckglas-Nährmedium gemäß dem Snelliusschen Brechungsgesetz

$$\frac{\sin \alpha_1}{\sin \alpha_2} = \frac{n_2}{n_1}$$

zur Normalen N hin gebrochen. Dabei bezeichnen n_1 und n_2 die Brechungsindizes des Mediums, aus dem der Strahl kommt bzw. in das er eindringt. In unserer Betrachtung wird dabei nur die Brechung im Nährmedium betrachtet, da der zusätzliche Versatz im Deckglas wegen dessen geringer Dicke vernachlässigt werden kann.

Die Distanz zwischen wirklicher und beobachteter Position des Objektes, also der Abstand zwischen ungebrochenem Strahl E' und gebrochenem Strahl B in der Objektebene kann dann berechnet werden mit:

$$\Delta x = D \cdot \tan(\alpha_1 - \alpha_2)$$

Um den Einfluss dieses Fehlers abschätzen zu können, wurde x für einen einseitigen Abstand des Deckels von der Oberfläche des Gehäuses von 0,2mm berechnet. Dabei tritt mit den Abmessungen der zweiten Version des Zellgefäßes eine Bildverschiebung von etwa $5\mu\text{m}$ auf. Bei Zellkerndurchmessern im Bereich von etwa $10\mu\text{m}$ wäre durch eine solche Ungenauigkeit unklar, ob ein Ion, das auf das Zentrum des Zellkerns gezielt wurde, diesen überhaupt durchquert.

Um diesem Problem zu begegnen, wurde bei der nächsten Version darauf geachtet, dass der Deckel immer möglichst eben auf dem Metall aufsitzt.

- Die Dicke der Schicht des Nährmediums beeinträchtigt die Qualität, mit der die Zellen mikroskopiert werden können. Dies machte sich speziell bei der Fluoreszenzmikroskopie durch wesentlich längere Belichtungszeiten im Vergleich zu einer dünnen Mediumsschicht bemerkbar. Deshalb wurde die Schichtdicke des Nährmediums, von der auch der optische Versatz linear abhängt, verringert.

4.2.3 Dritte Version



Abb. 4.11 Schematische Darstellung der dritten Version des Zellgefäßes

Bei der dritten Version des Zellgefäßes (siehe Abb. 4.11) wurde die Schichtdicke des Nährmediums bei geschlossener Kammer von 2,0mm auf 0,5mm reduziert, was das Mikroskopieren vereinfacht und den optischen Fehler bei gekipptem Deckel im Vergleich zur vorhergehenden Version um den Faktor vier verkleinert.

In Anlehnung an das bei der PTB verwendete Zellgefäß [FRA02] [GRE04] wird die Kammer durch ein einfaches Deckglas verschlossen, das auf das Metall aufgelegt wird. So kann überflüssiges Nährmedium leicht entweichen und die Ausbeulung der Folie durch Überdruck verhindert werden.

Die Haftung des Deckglases wird durch die Oberflächenspannung des zwischen Glas und Metall eingeschlossenen Nährmediums gewährleistet. Da in diesem Fall keine äußeren

Kräfte auf das Deckglas einwirken, kann davon ausgegangen werden, dass es immer vollflächig auf dem Edelstahl aufliegt und damit nach dem Einbau des Gefäßes in die Mikrosonde senkrecht zur optischen Achse des Mikroskops steht.

Bei Experimenten mit diesem Zellgefäß trat ein neues Problem auf: An den Rändern des Deckglases verdunstet Nährmedium, das durch die Kapillarkräfte, die in der dünnen Schicht zwischen Deckglas und Metall entstehen, aus dem Innern der Kammer ständig ersetzt wird. Dadurch entsteht in der Kammer ein Unterdruck, der eine Beulung der Folie nach innen bewirkt. Dies hat bei einer Bestrahlung den Nachteil, dass sich zum Einen der Luftspalt zwischen Vakuumfenster und Folie vergrößert, wodurch die Ionen stärker gestreut werden, zum Anderen dadurch ein Nachfokussieren der Optik beim Mikroskopieren notwendig wird.

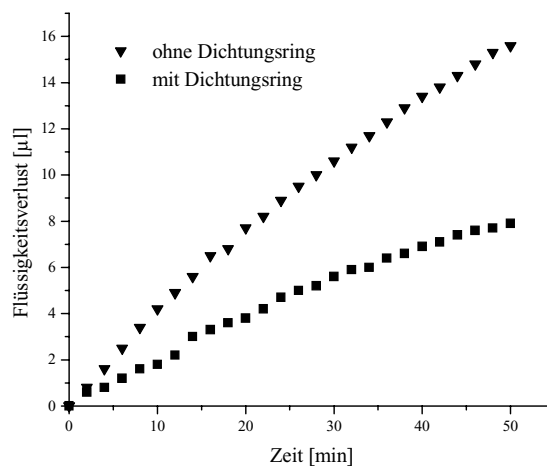


Abb. 4.12 Flüssigkeitsverlust in den Kammern

Der erste Versuch, dieses Problem zu beheben, bestand darin, einen Dichtungsring in die Kammer einzulegen, der sowohl am Deckglas als auch an einer Nut im Metallkörper anliegt und somit um den Rand des Deckglases ein abgeschlossenes Volumen erzeugt. Sobald die Luft darin mit Wasserdampf gesättigt ist, sollte kein weiterer Flüssigkeitsverlust mehr auftreten. Wie Abb. 4.12 zeigt, war dieser Versuch nur teilweise erfolgreich, was daran liegt, dass auch durch die dünne Bodenfolie Flüssigkeit entweicht.

Da sich dieser Flüssigkeitsverlust nicht vollständig vermeiden lässt, kann das Problem der Ausbeulung des Bodens nur durch eine Belüftung des Gefäßinnenraumes behoben werden. Diese wurde in der vierten Version des Zellgefäßes verwirklicht.

4.2.4 Vierte Version



Abb. 4.13 Schematische Darstellung der vierten Version des Zellgefäßes

In der vierten, zum Zeitpunkt dieser Dissertation aktuellen Version des Zellgefäßes wurde

die vorherige insofern erweitert, als der Innenraum des Gefäßes über eine Nut in der inneren Auflagefläche belüftet wird. Damit sich beim Verdunsten von Flüssigkeit keine Luftblasen zwischen Bodenfolie und Deckglas bilden, die zum einen erheblich bei der Mikroskopie stören würden und zum anderen zum Trocknen und damit zur Beschädigung von Zellen führen können, dient die Belüftungsnut auch als Vorratsgefäß für Nährlösung. Damit der Vorrat ausreicht um die während der Bestrahlung verdunstende Flüssigkeitsmenge zu ersetzen, war eine Erhöhung des Metallrandes und damit auch des Abstands zwischen Folie und Deckglas auf 0,8 mm erforderlich.

Der in der vorherigen Version eingeführte Dichtungsring wurde auch in diesem Design beibehalten, da dadurch die Verdunstungsrate deutlich gesenkt werden konnte. Durch ihn wird außerdem das Deckglas gleichmäßig auf die Metallfläche gedrückt, wodurch ein vollflächiges Aufliegen noch besser als in der vorherigen Version sichergestellt ist.

4.3 Zellwachstum

Für die Untersuchung biologischer Fragestellungen ist es von besonderer Bedeutung, dass sich die Zellen in den verwendeten Gefäßen möglichst genauso wie in Standard-Petrischalen verhalten. Die Suche nach den richtigen Materialien, der richtigen Vorbehandlung des Zellgefäßes und den optimalen Parametern bei der Aussaat und der Behandlung der Zellen nahm daher einen Großteil der Entwicklungsarbeit der Zellgefäße in Anspruch.

Problematisch bei dieser Optimierung war, dass im Gegensatz zur Messung von Wachstumsraten, wie sie bereits in Kapitel 4.1 bei der Materialauswahl dargestellt wurden, das Anhaftungsverhalten, die Morphologie und die Fähigkeit der Zellen, einen konfluenten (einschichtigen und dichten) Zellrasen zu bilden, nur schwer quantitativ messbar sind. Die Bewertung des Zustandes von Zellen in auf neue Art präparierten Gefäßen erfolgte daher hauptsächlich durch Vergleiche mit Zellen in erprobten Referenzgefäßen oder das Aussehen wurde nach Erfahrungswerten beurteilt.

Die Auswertung dieser Versuche führte zu einer ständigen Verbesserung der Präparationsmethode der Zellgefäße. Im Folgenden wird als Ergebnis unserer Arbeit die zum jetzigen Zeitpunkt als optimal betrachtete Methode dargestellt, die auch bei den Kammern für die aktuellen Mikrosonden-Experimenten angewandt wurde.

4.3.1 Vorbehandlung der Folie

Polypropylen, das als Bodenfolie für das Zellgefäß ausgewählt wurde, ist sehr hydrophob. In unseren Versuchen stellte sich heraus, dass die Zellen wesentlich besser anhaften und sich vermehren können, wenn die Folie durch Chemikalien etwas hydrophiler gemacht wird, bevor sie mit Cell-Tak beschichtet wird (siehe Kapitel 4.3.4 „Vorbehandlung der montierten Kammer“). Dazu wurden zwei Methoden getestet, die zu vergleichbaren Ergebnissen führten:

- ein etwa einstündiges Bad in 30%igem H_2O_2 bei einer Temperatur von 70°C
- waschen in einer 2%-igen Lipsol-Lösung (L.I.P., Shipley (UK)) für etwa 15 Stunden.

Nach beiden Prozeduren muss die Folie zum Entfernen der Chemikalien einige Stunden in destilliertem Wasser gewaschen werden. Danach kann die Folie getrocknet und in das Gehäuse des Zellgefäßes eingebaut werden. Auf diese Weise behandelte Folien können für mehrere Wochen aufbewahrt werden, ohne dass sich ihre Eigenschaften in Bezug auf die Zellanhaftung verschlechtern

Da die Methode mit der Lipsol-Lösung weniger arbeitsintensiv ist, wurde sie bei der Präparation der Zellgefäße für die Experimente benutzt.

4.3.2 Vorbehandlung des Gehäuses

Im Gegensatz zur Bodenfolie wird das Gehäuse des Zellgefäßes wieder verwendet. Bevor es jedoch neu montiert werden kann, durchläuft es einen vierstufigen Reinigungsprozess:

- In heißem destilliertem Wasser wird das alte Wachs entfernt, mit dem die Bodenfolie angeklebt wurde.
- Für eine allgemeine Reinigung wird das Gehäuse etwa 30 Minuten in eine 2%-ige Lipsol-Lösung (L.I.P., Shipley (UK)) gelegt.
- Um eine erste Sterilisation durchzuführen, wird das Gehäuse für etwa 10 Minuten in 70%-iges Ethanol gegeben.
- Danach werden die Kammern durch ein mehrstündiges Bad in destilliertem Wasser von den Chemikalien befreit.

Nach diesen Reinigungsschritten kann die Bodenfolie auf das Gehäuse aufgebracht werden.

4.3.3 Montage des Zellgefäßes

Zur Montage der Zellgefäße werden die Unterseiten der Gehäuse dünn mit Stearin beschichtet und mit dieser Seite nach oben auf eine beheizbare Metallplatte gelegt.

Die Bodenfolie wird auf einen Metallring aufgeklebt und dann so auf die Gehäuse gelegt, dass sie vollflächig auf ihnen aufliegt. Dabei sorgt die Gewichtskraft des Metallrings dafür, dass die Folie gespannt wird.

Nun wird die Metallplatte so lange geheizt, bis das Stearin zwischen Gehäuse und Folie schmilzt. Durch leichtes Andrücken der Folie mit einem weichen Gegenstand wird zum einen sichergestellt, dass das Wachs gut mit der Folie in Kontakt kommt, zum anderen können kleinere Luftblasen entfernt werden. Nach dem Abkühlen wird die Folie entlang der Ränder des Gehäuses mit einem Skalpell abgeschnitten.

4.3.4 Vorbehandlung der montierten Kammer

Nach der Montage muss das Zellgefäß sterilisiert werden. Hierzu wird es für 30 Minuten in 70%-iges Ethanol gegeben und danach in einer Flow-Box zum Trocknen aufgestellt. Die Benutzung eines Autoklavs zur Sterilisation ist nicht möglich, weil das Stearin, das zum Kleben der Folie auf das Gehäuse verwendet wird, bereits bei etwa 60°C schmilzt. Außerdem wurde festgestellt, dass sich die Oberfläche der Folie beim Autoklavieren so verändert, dass die Zellen daran nicht mehr anhaften.

Nach der Sterilisation wird die Folie mit Cell-Tak (BD Biosciences, Bedford (USA)), einer Proteinlösung, die die Anhaftung von Zellen auf Oberflächen verbessert, beschichtet. Diese Präparation wird auch von Folkard et al. [FOL97a] berichtet, die im Gray-Lab ebenfalls die Polypropylenfolie in ihren Zellgefäßen benutzen. Dabei wurde die Erfahrung gemacht, dass für die von uns verwendeten Zellarten eine Konzentration von 3,5µg/cm² optimal ist.

Nach diesem Schritt können die Zellen in die Gefäße eingesät werden.

4.3.5 Einsaat und Kultivierung der Zellen

Bei unseren Versuchen wurden CHO-K1 Zellen und menschliche Fibroblasten (AG 1522) verwendet (siehe Fußnote Seite 13). Dabei stellte sich heraus, dass sich beide Zellarten umso besser entwickeln, je dichter die Zellen eingesät werden. Die Herstellung einer Probe mit dichtem Zellrasen ist daher leicht machbar. Problematisch ist bis jetzt noch die Kultivierung sehr vereinzelter Zellen (weniger als 50 pro Zellgefäß). Solche Proben werden

aber für die Untersuchung von Koloniebildungen nach der Bestrahlung benötigt. Daher werden in diese Richtung noch weitere Untersuchungen stattfinden müssen.

Bei den bisherigen Mikrosonden-Experimenten wurden ausschließlich Proben mit dichtem Zellrasen aus Fibroblasten verwendet. Um diesen zu erzeugen, wurden pro Gefäß zwischen 5000 und 8000 Zellen (automatische Zählung mittels Coulter-Counter) in einem Tropfen aus 40µl Nährlösung in der Mitte der Bodenfolie aufgebracht (centerplated). Erst nachdem die Zellen nach etwa 3 Stunden an der Bodenfolie anhafteten haben, wurde die Kammer mit weiteren 200µl Nährlösung gefüllt. Durch diese Behandlungsmethode ist nur der zentrale Bereich der Gefäße mit Zellen bedeckt. Die Zeit, die die Zellen benötigen, um dann einen konfluenten Zellrasen zu bilden, hängt stark von deren Alter ab und variiert zwischen zwei und vier Tagen.

Nach der Aussaat der Zellen werden die Kammern in sterilen Behältern in einen Brutschrank bei 37°C, 5% CO₂ und 98% Luftfeuchtigkeit kultiviert. In unseren Versuchen stellte sich heraus, dass die Zellen wesentlich besser anhaften und wachsen, wenn die Luft innerhalb der Behälter mit zusätzlichem Wasserdampf gesättigt ist. Dies kann durch Zugabe einer Schale destillierten Wassers erreicht werden.

Kapitel 5

Das Vakuumfenster

Mit dem Vakuumfenster wird das evakuierte Strahlrohr, in dem sich der Ionenstrahl bewegen kann, ohne gestreut zu werden, gegen die Bestrahlungskammer abgeschlossen, in der sich die Zellen befinden und in der normaler Umgebungsdruck herrscht (siehe Abb. 5.1).

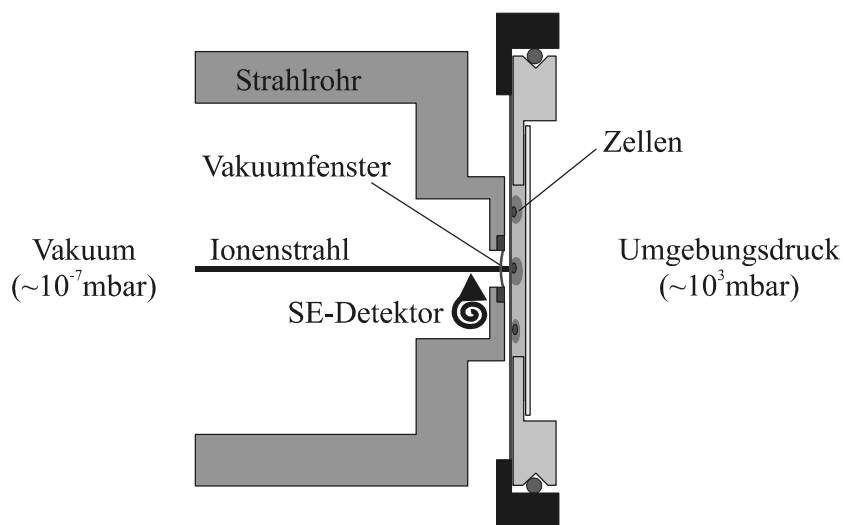


Abb. 5.1 Schema zur Position des Vakuumfensters im Bestrahlungsaufbau

Bei der Bestrahlung durchqueren die fokussierten Ionen dieses Fenster und erreichen dann nach einer Strecke von etwa $100\mu\text{m}$ das Zellgefäß, in dem die gezielte Energiedeposition in den Zellen stattfindet. Die beim Durchgang eines Ions vom Vakuumfenster emittierten Sekundärelektronen werden zur Trefferdetektion mit einem Channeltron nachgewiesen.

5.1 Eigenschaften

5.1.1 Mechanische Eigenschaften

Um die oben beschriebenen Aufgaben erfüllen zu können, muss das Vakuumfenster verschiedene mechanische Eigenschaften besitzen:

- Es muss sehr dünn sein, damit die fokussierten Ionen beim Durchgang möglichst wenig gestreut werden, denn bei einer Strecke von etwa $100\mu\text{m}$, die die Ionen zwischen dem Fenster und den Zellen zurücklegen müssen, führen schon kleine Streuwinkel zu deutlichen Abweichungen vom Zielpunkt.
- Es muss stabil genug sein, um den Druckunterschied von etwa einem Bar, der zwischen Strahlrohr und Umgebung besteht, aushalten zu können,
- Es muss strahlungsbeständig sein, da die lokale Fluenz der Ionen in dem Bereich, in dem sie das Fenster durchdringen, durch die Fokussierung sehr hoch ist.

5.1.2 Eigenschaften zur Trefferdetektion

Für die Wahl, die vom Vakuumfenster emittierten Sekundärelektronen zur Trefferdetektion zu verwenden, gibt es zwei Gründe:

- Ein Treffernachweis hinter dem Zellgefäß (siehe Kapitel 4 "Das Zellgefäß") ist nicht möglich, da es von den Ionen aufgrund seiner Dicke nicht durchdrungen werden kann.
- Zusätzliche Materialsichten wie Szintillatoren, Halbleiter- oder Gasdetektoren, mit denen der Treffernachweis vor der Probe durchgeführt werden kann, führen zu weiteren Streuungen der Ionen und verschlechtern damit die Zielgenauigkeit der Mikrosonde. Da das Vakuumfenster in unserem Aufbau ohnehin benötigt wird, wird bei der Trefferdetektion mit Hilfe der Sekundärelektronen der Strahlfokus nicht zusätzlich aufgeweitet.

Für den Nachweis der Sekundärelektronen wird ein Channeltron verwendet, dessen Aufbau in Abb. 5.2 schematisch dargestellt ist.

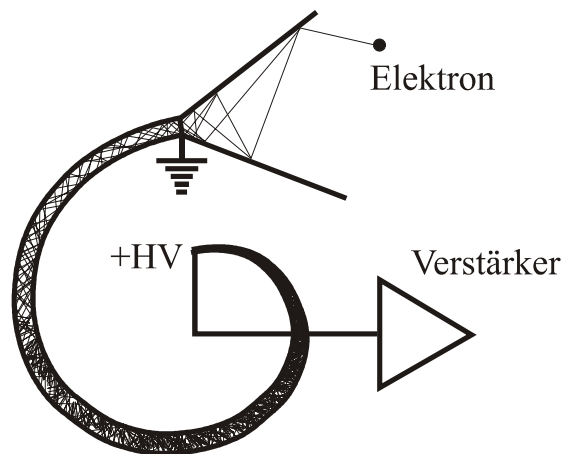


Abb. 5.2 Schema zu Aufbau und Wirkungsweise eines Channeltrons: Jedes Elektron, das auf die Wand des Channeltrons trifft, schlägt neue Elektronen frei. Diese werden durch eine positive Hochspannung zum inneren Ende hin beschleunigt und erzeugen auf ihrem Weg dorthin immer mehr freie Elektronen. So kann am inneren Ende des Channeltrons ein Stromimpuls detektiert werden

Sobald ein Elektron den Trichter des Channeltrons erreicht, wird es durch eine positive Hochspannung zum inneren Ende hin beschleunigt und schlägt bei jeder Berührung der Wand neue Elektronen frei. Durch die so entstehende lawinenartige Vermehrung der Elektronen kann am inneren Ende des Channeltrons ein Stromsignal abgegriffen werden, dessen Amplitude mit der Anzahl der primären Elektronen steigt. Da die Elektronenvermehrung jedoch nicht kontrolliert abläuft, gibt es für die gleiche Anzahl primärer Elektronen statistische Schwankungen der Signalhöhe.

In Abb. 5.3 ist das Amplitudenspektrum eines Channeltrons zu sehen, das bei der Bestrahlung von Gold mit Xe-Ionen (5,9 MeV/u) aufgenommen wurde. Darin kann deutlich zwischen zwei Signalhöhen unterschieden werden: Die Signale mit hoher Amplitude (um Kanal 2000) wurden durch die von der Goldoberfläche emittierten Sekundärelektronen erzeugt, während die Impulse mit niedriger Amplitude (um Kanal 250) durch einzelne, im Vakuum vorhandene Elektronen generiert wurden. Durch Anlegen eines Grenzwertes in diesem Spektrum kann klar zwischen Hintergrundsignalen und echten Ionentreffern unterschieden werden.

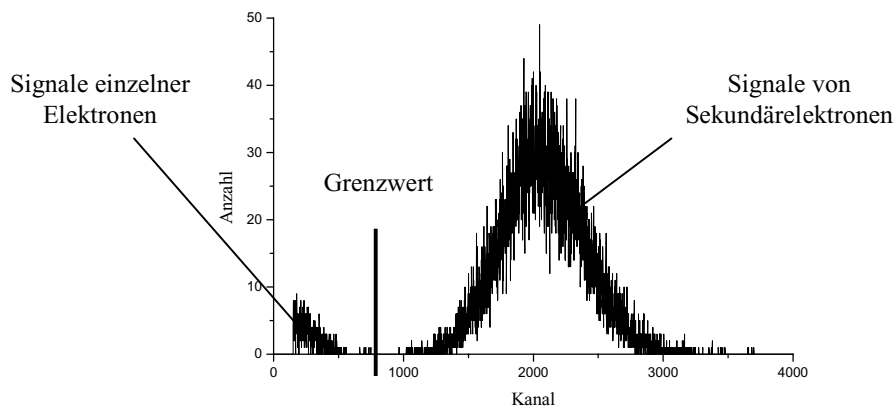


Abb. 5.3 Amplitudenspektrum eines Channeltrons, das bei Bestrahlung einer Goldoberfläche mit Xe-Ionen (5,9MeV/u) aufgenommen wurde

Um bei der Zellbestrahlung eine zuverlässige Trefferdetektion durchführen zu können, müssen die Signale, die beim Durchgang von Ionen durch das Vakuumfenster entstehen deutlich höhere Amplituden besitzen, als die durch freie Elektronen erzeugten Impulse. Dies kann nur erreicht werden, wenn das Vakuumfenster eine hohe Sekundärelektronenausbeute besitzt und so bei jedem Teilchendurchgang viele primäre Elektronen das Channeltron erreichen.

5.2 Getestete Materialien

Bei der Suche nach einem geeigneten Material für das Vakuumfenster wurden Si_3N_4 -Folien und B-dotierter Diamant intensiv untersucht.

5.2.1 B-dotierter CVD-Diamant

Dieser CVD-Diamant, bei dessen Synthese geringe Mengen an Bor zugesetzt wurden, wurde vor allem aufgrund seiner hohen Sekundärelektronenausbeute bei Bestrahlung mit keV-Elektronen [SHI97] als Vakuumfenster in unserem Aufbau in Betracht gezogen.

Die durchgeführten Experimente zum Treffernachweis von Ionen zeigten, dass bei Ionen schwerer Elemente wie Xe deutlich zwischen Hintergrundsignalen und den durch Sekundärelektronen erzeugten Signalen unterschieden werden kann. Bei Bestrahlung mit Kohlenstoffionen war die Anzahl der emittierten Elektronen jedoch deutlich niedriger, so dass der Peak der Treffersignale im Amplitudenspektrum des Channeltrons zum Teil deutlich mit dem Hintergrundspektrum überlappt (siehe Abb. 5.4).

Bei diesen Experimenten wurde außerdem festgestellt, dass die Sekundärelektronenausbeute zwischen den einzelnen Fenstern stark variiert. Wie die Channeltron-Spektren in Abb. 5.4 zeigen, hängt die Anzahl der emittierten Elektronen dabei nicht vom angegebenen Bor-Gehalt in den Diamanten ab. Da dies aber die einzige Variable ist, in der sich die verschiedenen Proben unterscheiden sollen, muss davon ausgegangen werden, dass entweder die wahren Dotierungsraten bedingt durch den Herstellungsprozess nicht mit den angegebenen übereinstimmen, oder eine andere Eigenschaft des Diamanten für die Anzahl der emittierten Sekundärelektronen von Bedeutung ist, die von den Herstellern bisher nicht

beeinflusst werden kann. Dies bedeutet aber, dass jedes Fenster vor der Verwendung auf dessen Tauglichkeit für die Trefferdetektion getestet werden müsste.

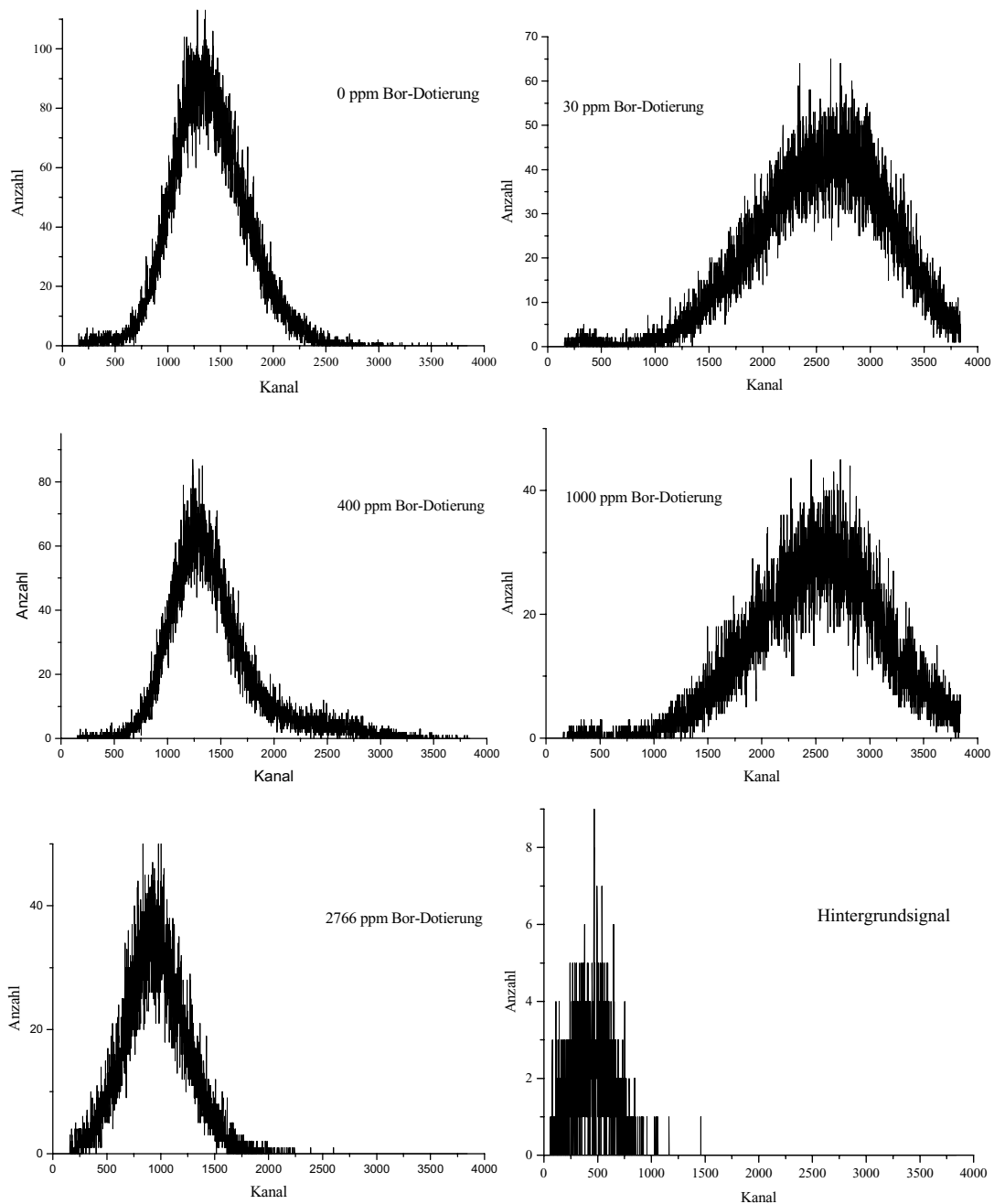


Abb. 5.4 Channeltron-Amplitudenspektren bei Bestrahlung von verschieden stark Bor-dotierten CVD-Diamanten mit 3,6MeV/u C-Ionen (die Ordinatenskalierung der Diagramme variiert)
Rechts unten: Hintergrund-Spektrum

Ein weiterer Nachteil der Bor-dotierten Diamanten ist die Tatsache, dass es dafür keine kommerziellen Hersteller gibt. Die von uns untersuchten Proben wurden von Jim Butler (Naval Research Labs., Washington, USA) und Paul May (University of Bristol, Bristol,

U.K.) zur Verfügung gestellt. Außerdem ist nach Aussage dieser Experten die Produktion von Fenstern mit Dicken unter einem Mikrometer nicht möglich. Um die Streuung der Ionen durch ein solches Fenster in unserem Aufbau abschätzen zu können, wurde sie mit SRIM-2003 [ZIE85] [SRIM2003] für C-Ionen (5MeV/u) durch ein 1µm dickes Diamantfenster und 100µm Luft simuliert. In Abb. 5.5 ist als Ergebnis die Abstandsverteilung der Ionen vom Zielpunkt zu sehen. Die sinkende Anzahl der Ionentreffer vom Maximum bei etwa 90nm zum Nullpunkt hin, ist durch die Abnahme der Trefferfläche zu erklären.

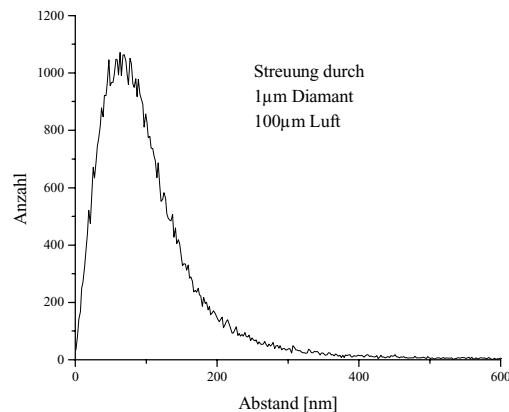


Abb. 5.5 Abstandsverteilung vom Zielpunkt eines 5MeV/u Kohlenstoff-Strahls bei Streuung durch ein 1µm dickes Diamantfenster und 100µm Luft

Da bei der GSI praktisch keine Bestrahlungen mit Ionen durchgeführt werden, die leichter als Kohlenstoff sind, und die Streuung für schwerere Teilchen geringer ist, kann nach obiger Simulation davon ausgegangen werden, dass beim Einbau eines 1µm dicken Diamantfensters 98 % der Teilchen nicht mehr als 400nm gestreut werden.

5.2.2 Siliziumnitrid (Si₃N₄)-Folien beschichtet mit Gold und CsI

Si₃N₄-Folie wird bereits seit einigen Jahren als Vakuumfenster in verschiedenen Aufbauten in denen ein fokussierter Ionenstrahl an Luft benötigt wird, als Vakuumfenster eingesetzt [LEF91] [CAL00]. Dort wurde bereits gezeigt, dass dieses Material ab Dicken von 100nm Druckunterschiede von einem Bar bei einer Fenstergröße von 1 x 1 mm² auch nach intensiver Bestrahlung mit Protonen und Alpha-Teilchen im MeV-Bereich standhält. Diese Strahlungsbeständigkeit wurde für schwerere Ionen durch eigene Versuche bestätigt, bei denen ein 200nm dickes Fenster mit $1 \cdot 10^{11}$ C-Ionen (3,6MeV/u)/cm² und $6 \cdot 10^8$ Fe-Ionen (4,8 MeV/u)/cm² bestrahlt wurde.

Zur Erhöhung der Sekundärelektronenausbeute beim Durchgang eines Ions wurde die Siliziumnitrid-Folie mit Gold und CsI beschichtet. Dabei sorgt das CsI für eine erhöhte Emission von Elektronen, während durch die darunter liegende leitende Goldschicht die Aufladung der Probe und damit eine Reduzierung der Elektronenausbeute verhindert wird. Die Untersuchung der zur maximalen Sekundärelektronenemission nötigen CsI-Schichtdicke (siehe Abb. 5.6) zeigte, dass diese bei etwa 20µg/cm² (entspricht etwa einer Dicke von 40nm) bei einer Goldschichtdicke von etwa 20nm erreicht wird. Da nicht ausgeschlossen werden kann, dass die CsI-Schicht während der Bestrahlung durch Sputtern

dünnere wird, wurde bei allen weiteren Experimenten mit $50\mu\text{g}/\text{cm}^2$ (ca. 100nm Dicke) gearbeitet.

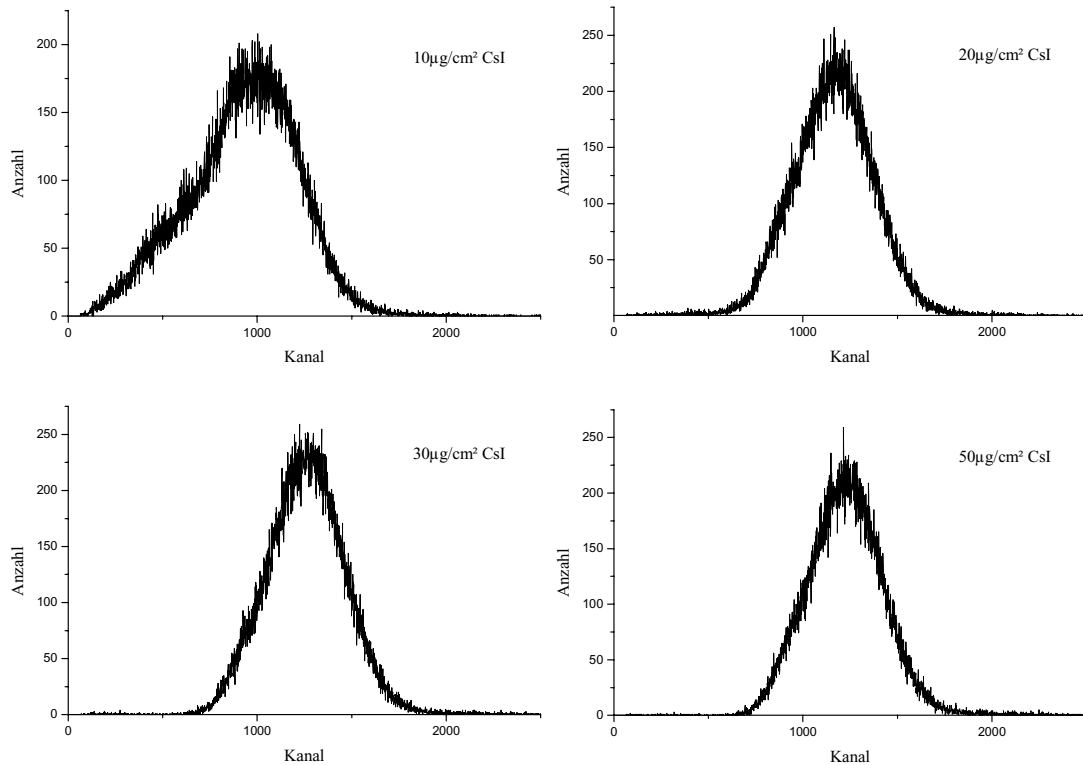


Abb. 5.6 Channeltron-Spektren von unterschiedlich dick CsI beschichteten Si₃N₄-Fenstern bei Bestrahlung mit 4,7MeV/u C-Ionen (die Ordinatenkalibrierung der Diagramme variiert)

Bei Bestrahlung mit 4,7MeV/u C-Ionen kann ab CsI-Dicken von etwa $20\mu\text{g}/\text{cm}^2$ der in Kapitel 5.1.2 beschriebene Grenzwert zur Diskriminierung der Ionensignalen von den Untergrundsignalen gesetzt werden (siehe Abb. 5.6). Da die Sekundärelektronenausbeute bei Bestrahlung mit schwereren Ionen steigt, eignet sich dieses Fenstermaterial ebenfalls zur Trefferdetektion.

Um die Streuung durch dieses Fenster abschätzen zu können, wurde sie für einen fokussierten Kohlenstoff-Ionenstrahl (5MeV/u) 100 μm hinter einem mit 100nm CsI und 20nm Gold beschichteten 200nm dicken Siliziumnitrid-Fenster mit SRIM-2003 simuliert (siehe Abb. 5.7).

Im Vergleich zu den simulierten Daten der Streuung durch ein Diamantfenster ist diese Verteilung etwas breiter. Beim Einbau eines solchen Vakuumfensters in unseren Aufbau kann davon ausgegangen werden, dass 98% der Teilchen nicht weiter als 650nm gestreut werden.

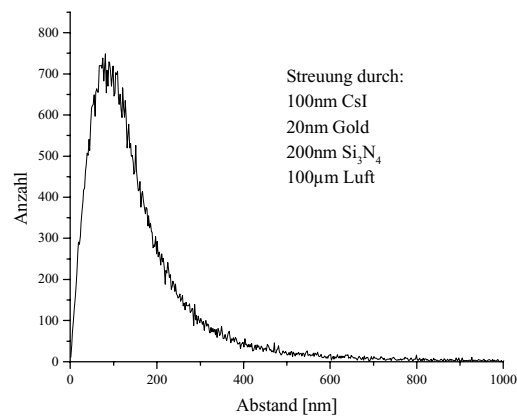


Abb. 5.7 Abstandsverteilung vom Zielpunkt eines 5MeV/u Kohlenstoff-Strahls bei Streuung durch ein 200nm dickes, mit 100nm CsI und 20nm Gold beschichtetes Si₃N₄-Fenster und 100µm Luft

5.2.3 Materialauswahl

Nach den in den vorigen Unterkapiteln beschriebenen Experimenten wurde sich dafür entschieden, die mit CsI und Gold beschichtete Si₃N₄-Folie als Vakuumfenster zu verwenden. Ausschlaggebend dafür war hauptsächlich die bessere Eignung als Trefferdetektor, wobei nicht nur die hohe Sekundärelektronenausbeute, sondern auch die Reproduzierbarkeit dieser Messung bei verschiedenen Fenstern von Bedeutung war.

Diese gleich bleibenden Eigenschaften können erreicht werden, da die Folie mit definierter Beschaffenheit kommerziell erworben werden kann und die Beschichtung mit Gold und CsI im Targetlabor der GSI durchgeführt wird. Da so die Versorgung mit qualitativ konstant hochwertigen Fenstern gesichert ist, ist es möglich, nach jeder Strahlzeit einen Fensterwechsel durchzuführen, wodurch eventuell durch die Bestrahlung oder Feuchtigkeitseinflüsse hervorgerufene Veränderungen der CsI-Schicht sofort behoben werden können.

Der Nachteil der im Vergleich zu den dünnst möglichen Diamantfenstern etwas größeren Streuung der Ionen bleibt dabei in einer Größenordnung, die bei der Bestrahlung einzelner Zellkerne mit durchschnittlichen Durchmessern von etwa 15µm nicht ins Gewicht fällt.